

WO98046739

Publication Title:

WO98046739

Abstract:

Abstract not available for WO98046739 Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

This Patent PDF Generated by Patent Fetcher(TM), a service of Stroke of Color, Inc.

ATTORNEY DOCKET NUMBER: 8449-304-999
SERIAL NUMBER: 10/530,393
REFERENCE: B07

BEST AVAILABLE COPY

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 15/11, C12P 21/00, C07K 14/725, G01N 33/53, 33/577, C07K 16/28, C12P 21/08	A1	(11) 国際公開番号 WO98/46739 (43) 国際公開日 1998年10月22日(22.10.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP97/02540 (22) 国際出願日 1997年7月23日(23.07.97) (30) 優先権データ 特願平9/115303 1997年4月16日(16.04.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 財団法人 化学及血清療法研究所 (JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO- THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE)[JP/JP] 〒860 熊本県熊本市大窪一丁目6番1号 Kumamoto, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 杉村和久(SUGIMURA, Kazuhisa)[JP/JP] 〒890 鹿児島県鹿児島市郡元1丁目21-40 鹿児島大学内 Kagoshima, (JP) (74) 代理人 弁理士 青山 蓓, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)		(81) 指定国 CA, US. 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: IMMUNOMODULATORY MOLECULES AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME (54)発明の名称 免疫制御分子およびその製造方法 (57) Abstract Immunomodulatory molecules which undergo, in the activation of T cells by antigen presenting cells, mutual interaction with molecules relating to the auxiliary impulse signal conduction on the antigen presenting cells and/or T cells to thereby regulate the auxiliary impulse signal conduction. These molecules each has a peptide having two cysteine (Cys) residues forming a Cys-Cys bond and having a sequence consisting of at least six amino acids in the Cys-Cys bond. These molecules can be obtained by screening a phage random peptide library with the use of a monoclonal antibody against CTLA-4 on the T cells relating to auxiliary impulse signal conduction.		

(57)要約

抗原提示細胞によるT細胞活性化において、抗原提示細胞上及び／またはT細胞上の補助刺激シグナルの伝達に関与する分子に相互作用することにより補助刺激シグナルの伝達を制御する免疫制御分子、及びその製造方法を提供する。該免疫制御分子は、2個のシステイン(Cys)残基を有し、当該システイン残基はCys-Cys結合を形成しており、かつ当該Cys-Cys結合間に少なくとも6個のアミノ酸からなる配列を有するペプチドを含有する。該免疫制御分子は、補助刺激シグナルの伝達に関するT細胞上のCTLA-4に対するモノクローナル抗体を用いて、ファージランダムペプチドライブラリーをスクリーニングすることにより得られる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AM	アルメニア	FR	フランス	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AT	オーストリア	GA	ガボン	LT	リトアニア	SN	セネガル
AU	オーストラリア	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国	TR	トルコ
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MW	マラウイ	US	米国
CA	カナダ	ID	インドネシア	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CG	コンゴ	IL	イスラエル	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CH	スイス	IS	アイスランド	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CI	コートジボアール	IT	イタリア	NZ	ニュー・ジーランド		
CM	カメルーン	JP	日本	PL	ポーランド		
CN	中国	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CU	キューバ	KG	キルギスタン	RO	ルーマニア		
CY	キプロス	KP	北朝鮮	RU	ロシア		
CZ	チェコ	KR	韓国	SD	スーダン		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SE	スウェーデン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SG	シンガポール		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SI	スロヴェニア		
ES	スペイン	LK	スリ・ランカ				

明 細 書

免疫制御分子およびその製造方法

技術分野

本発明は、T細胞活性化に関与した第一シグナルに続く補助刺激シグナルに関与した分子間の相互作用を制御する免疫制御分子及びその製造方法に関するものであり、当該分子を利用して免疫系を制御することができる。さらに詳細には、本発明は、補助刺激シグナルの伝達に関与した分子間の結合を阻止し、かつ当該分子の立体構造を認識するモノクローナル抗体を用いて、ファージランダムペプチドライブラリーより得られる、目的タンパク分子の三次構造を模倣したペプチド配列をもつ免疫制御分子及びその製造方法に関する。

背景技術

免疫反応はT細胞の活性化から始まる。生体内に入り込んだ抗原はマクロファージやB細胞のような抗原提示細胞（以下、APCと称することもある）に取り込まれる。次に、抗原断片を取り込んだ抗原提示細胞は細胞膜面上に主要組織適合性抗原（MHC）のクラスⅠもしくはクラスⅡと抗原（Ag）との複合体を提示する。そしてこのMHC/Ag複合体は、T細胞上のT細胞抗原レセプター（TCR）／CD3複合体により認識され第一シグナルをT細胞内に送る。第二シグナルは補助刺激シグナル

（costimulatory signal）とも呼ばれ、T細胞、APC双方の細胞膜上に発現する接着分子間の相互作用によりT細胞内に送られる。T細胞の活性化には第一と第二の両方のシグナルが必要であり、第二シグナルである補助刺激シグナルを阻害するとTリンパ球が不活性化され、免疫学的不応答（アナジー）に陥ることが分かっている。この補助刺激シグナルは、AP

C上に発現するCD80（別名B7-1、B7/BB1）及びCD86（別名B7-2、B70）、そのカウンターレセプターであるT細胞上に発現するCD28及び細胞障害性Tリンパ球関連抗原（CTLA-4）の相互作用により主に伝達され则认为られている（Lenschow, D. J., et al., Annu. Rev. Immunol. 14, 233-258, 1996）。

CD28分子はT細胞上に発現される糖タンパク分子であり、TCRからの刺激によるT細胞の増殖及びさまざまなサイトカイン産生を増強する補助刺激レセプターとして機能していることが明らかにされている。CTLA-4分子はCD28と構造的、機能的に非常に類似している分子として知られている。CTLA-4ノックアウトマウスでは、脾臓やリンパ節のT細胞が増え、心筋、甲状腺、膵臓などの多くの臓器にT細胞浸潤が起こり、自己免疫病により死亡することより、CTLA-4がT細胞応答のネガティブレギュレーターであることが示唆されている。CD28、CTLA-4のリガンドとして、1990年にLinsleyら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 5031-5035）によりCD80分子が、続いて1993年にAzumaら（Nature, 366, 76-79）によりCD86分子が同定された。CD80は膜貫通型糖タンパク質で細胞内領域は短く、シグナル伝達部を有しており、Igスーパーファミリーに分類されている。CD86はCD80同様、Igスーパーファミリーに分類される膜貫通型タンパク質であるが、CD80と異なり細胞内領域に3つの潜在的なプロテインキナーゼC依存性のリン酸化領域を持つことからシグナル伝達機能を有することが示唆されている。CD80、CD86ともT細胞の増殖、細胞障害活性、胸腺内におけるT細胞分化に関与している。CD28分子あるいはCTLA-4分子はCD80分子あるいはCD86分子にそれぞれ結合できる能力を有しており、これらの分子の発現時期や相互

作用によって、T細胞の活性化または抑制、ひいては免疫系全体が影響を受けると考えられている。

このようにCD28分子、CTLA-4分子、CD80分子及びCD86分子はT細胞の抗原応答やB細胞の相互作用など様々な免疫機能発現に極めて重要な役割を果たしており、MHC/Ag複合体とTCR/CD3複合体による第一のシグナルに続く補助刺激シグナルの主たる部分を担っている。従って、この補助刺激シグナルを制御することによって免疫系全体を制御することができると思われる。このような試みとしてCD28分子やCTLA-4分子に対する抗体を用いる試みがあり、抗CD3抗体で予め刺激しているT細胞に抗CD28抗体の存在下で抗CTLA-4抗体あるいは抗B7抗体を作用させることにより抗CD28抗体のT細胞活性化効果をさらに3倍弱増強している(Matthew F., et al., J. Exp. Med. 182, 459-465, 1995)。

生体内の情報伝達は、補助刺激シグナルの例で述べたように、細胞表面上に発現しているレセプター分子と、これに対応するリガンド分子との結合により送られるシグナルによって行われる。レセプターとリガンドはお互いに相補的な関係にあり、2つの分子の結合はお互い形の合う者同士でおこる。しかし、リガンド分子において結合に最も重要な部位は限られており、その相互作用部位の構造を明らかにすることでレセプターとリガンドの結合をブロックしたり促進したりすることができる。従来、あるレセプター-リガンド系でどちらか一方の相互作用部位を明らかにしようとする場合、そのタンパク質の全アミノ酸配列にわたって適当な長さのペプチドを合成し、その結合活性もしくは結合阻害活性により相互作用部位を明らかにするペプチドスキニング方法がとられていた。あるいは、部位特異的突然変異誘発法(site-directed mutagenesis)による結合部位への

関与を1つ1つのアミノ酸置換により調べる方法か、フォトアフィニティー法によりタンパク質同士の結合アミノ酸を特定化する方法が使われてきた。最近では、ファージランダムペプチドライブラリーを用いたスクリーニング方が行われるようになってきた。これはScottら（Science, 249, 386-390, 1990）によって開発された方法で、ファージの構成タンパク質であるpⅢ分子の遺伝子（geneⅢ）にランダムなペプチド分子をコードする遺伝子を挿入することにより、ランダムなペプチド分子を含んだ形のpⅢ分子をfd-tetファージ（繊維状一本鎖DNAのファージ）上に発現させ、ファージランダムペプチドライブラリーを作り、パンニングなどで結合ファージをスクリーニングし、そのpⅢ遺伝子のシーケンスを行って、相互作用部位を決定する方法である。この方法を用いると、数億種類にも及ぶペプチドの集合体を化学反応で合成するよりも容易に得られ、さらに必要に応じてその増幅が可能である。

ファージランダムペプチドライブラリーを利用して、ターゲット分子上の相互作用部位を同定することが試みられている。一般的には、レセプターあるいはリガンドを直接プレート上に固相化してパンニング法によりファージランダムペプチドライブラリーをスクリーニングする方法がとられている。しかし、相当数の目的分子に結合するファージクローンが得られ、その大多数は機能のない単なる結合ファージクローンであり、その中からレセプター-リガンドの相互作用を制御するようなペプチド配列を持ったファージを得ることは非常に効率が悪く、難しかった。また、抗原指向性がはっきりしている抗体を用いてファージライブラリーをスクリーニングする場合には、比較的効率よく結合ペプチドが得られている。例えば、抗p53モノクローナル抗体を用いてp53分子上のエピトープの決定を行っている例では、種々の長さのランダムペプチドライブラリーを用いている

が、抗 p 5 3 モノクローナル抗体によって得られたものは、全て p 5 3 上のアミノ酸配列にホモロジーの高いものであり、その結果からエピトープを同定している (Stephen, C. W., et al., J. Mol. Biol., 248, 58-78, 1995)。また、抗 b F G F 抗体を用いて 6 個のアミノ酸配列をもったファージランダムペプチドライブラリーをスクリーニングしたところ b F G F のアミノ酸配列に類似のペプチド配列が得られ、そのアミノ酸配列を 8 個に拡張して合成したペプチドが b F G F とそのレセプター F G F R-1 との結合を阻害したとの報告がある (Yayon, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 90, 10643-10647, 1993)。また、アセチルコリンレセプターに対してコンフォメーションなエピトープを認識する抗体に結合するモチーフを 6 個のアミノ酸をもつファージランダムペプチドライブラリーを用いてスクリーニングしたところ、アセチルコリンレセプターとはホモロジーがないが、この抗体と結合するペプチド配列が得られている。しかしながら、アセチルコリンと結合するか否かは何ら言及されていない (Balass, M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 90, 10638-10642, 1993)。

前述の補助刺激シグナルに関係している分子をターゲットにして免疫反応を制御しようとする試みとして、B 7 分子や C T L A-4 分子に対する抗体が用いられているが、その抗体の効果は T 細胞活性化を 3 倍弱増強するにとどまっており、十分に高いとはいえない。また、彼らの実験では、具体的な抗原を用いておらず、in vivo の免疫反応において効果があるとの確証は得られていない。抗体以外のものとして、特に、医薬品として望ましいと考えられる小分子を、このような補助刺激シグナルに関与した分子をターゲットにしてデザインする試みはまだ報告されていない。

一方、小分子をデザインするための情報として、ターゲット分子の相互

作用部位解析を行い、その相互作用部位のアミノ酸配列を元にペプチドを合成し、小分子をデザインするという方法がとられてきた。しかし、従来の蛋白分子同士の相互作用部位の解析法により相互作用部位のアミノ酸配列を明らかにし、そのアミノ酸一次配列をもとにオリゴペプチドを作製しても、ターゲット分子の機能を代替するような小分子の設計は困難であった。すなわち、重要な機能を有する蛋白分子の相互作用部位は三次構造によって規定されており、たとえ三次構造上相互作用に関与する部位が集積されていたとしても、一次配列上では相互作用部位が散在しているため、相互作用部位のアミノ酸一次配列をもとにオリゴペプチドを作製しても、相互作用部位の三次構造を再構成することは技術的に困難であり、機能小分子の設計は困難であった。

ファージランダムペプチドライブラリーを用いた検索でも、レセプターあるいはリガンドを直接固相化してパンニング法によりスクリーニングすると、レセプターーリガンドの相互作用を制御するような特別のペプチド配列を持ったファージを得ることは非常に効率が悪く、困難であった。さらに、抗体のような比較的、抗原指向性がはっきりしているタンパク分子を使ったスクリーニングでも、抗体が結合するターゲット分子のアミノ酸の一次配列あるいは、それとホモロジーの高いモチーフを同定することに使われてきており、ホモロジーがない場合は単に抗体と結合するだけのペプチド配列を示す場合がほとんどであった。すなわち、抗体の結合するターゲット分子の三次構造をアミノ酸の一次配列に依存せずに模倣する分子が得られたとの報告は未だされていない。ましてやAPC上に発現するCD80及びCD86と、そのカウンターレセプターであるT細胞上に発現するCD28及びCTLA-4をターゲットにして、免疫系を制御するような小分子を得たとの報告もない。さらに、ターゲット分子のアミノ酸の

一次配列に依存せずにそのような小分子を作製する試みがなされたという報告もない。

発明の開示

本発明は、T細胞活性化に関与したMHC/A g複合体とTCR/CD3複合体による第一シグナルに続く補助刺激シグナルに関与した分子間の相互作用を制御する免疫制御分子及びその作製方法を提供するものであり、当該分子を利用して免疫系を制御することができる。さらに詳細には、本発明は、補助刺激シグナルに関与した分子間の結合を阻止し、かつ当該分子の立体構造を認識するモノクローナル抗体を用いて、ファージランダムペプチドライブラリーより得られる、目的タンパク分子の三次構造を模倣したペプチド配列をもつ免疫制御分子及びその作製方法を提供する。

図面の簡単な説明

図1は、ファージランダムペプチドライブラリーのスクリーニングに用いた抗マウスCTLA-4モノクローナル抗体の特異性を示したものである。

図2は、抗CTLA-4抗体と結合するファージクローンのパンニングの結果得られた58個のファージクローンの抗マウスCTLA-4モノクローナル抗体との反応性を示したものである。

図3は、6種類のファージクローンの抗マウスCTLA-4モノクローナル抗体との結合性を示したものである。

図4は、6種類のファージクローンのマウスT細胞増殖に及ぼす影響を示したものである。

図5は、3種類のファージクローンのマウスCD80-I gへの結合能を示したものである。

図6は、F2配列を発現するファージクローンのマウスCD80-I g、

マウスCTLA-4-Ig、ヒトIgGへの結合活性を示したものである。

図7は、F2配列を発現するファージクローンのヒトCD80-Igへの結合活性を示したものである。

図8は、鶏卵リゾチーム免疫マウスに対するF2、F6配列を発現するファージクローンのT細胞増殖刺激活性を示したものである。

図9は、F2配列を発現するファージクローンのT細胞増殖刺激活性に対するCD80-Ig、CD86-Igの影響を示したものである。

図10は、F6配列を発現するファージクローンのT細胞増殖刺激活性に対するCD80-Ig、CD86-Igの影響を示したものである。

図11は、F2、F6配列を発現するファージの抗HBsAg抗体産生増強活性を示したものである。

発明を実施するための最良の形態

例えば、分子AとBの結合を阻害し分子Aの立体構造を認識する抗Aモノクローナル抗体を用いて、ファージランダムペプチドライブラリーからこの抗体に結合するファージクローンを単離する場合、用いた抗A抗体は分子A上の結合部位の三次構造の「鋳型」すなわち分子B上の結合部位の役割を果たすため、分子Aの結合部位の三次構造と類似している構造をファージ表面に提示したクローンに結合する。従来の分子Bをそのままスクリーニングに使用する方法では、分子B上に数多くのファージ結合可能部位があり、A-B分子間の相互作用に関係ない部分に結合するファージクローンも同時に得られることになってしまい、スクリーニング効率を非常に悪くしていた。一方、A-B分子間の相互作用に関係している部分の立体構造を認識する抗Aモノクローナル抗体を使うことにより、相互作用に関係している分子B上の部分の立体構造のみを抽出することになり、ターゲット領域を単一化することができ、その点でファージスクリーニングの効率

を飛躍的に上げることができる。この立体構造を保持するためにペプチド単独の状態にせずに、ファージ上に表現されたままで、分子Bとの結合活性によりスクリーニングすれば、最終的に分子Aと非常に構造の良く似た立体構造を持つペプチド配列を有するファージを選択することができる。このペプチド配列は分子Aと非常に構造がよく似ていることから、さらに、バイオアッセイ等により選択すれば、その分子Aのアゴニストやアンタゴニストとしての活性を明らかにすることができる。また、このようにして選択されたペプチド配列をもつファージクローンの中には、その立体構造が非常に分子Aと似ている構造をしていることから、分子Aのアゴニスト・アンタゴニスト的な活性ではなく、分子Aとは異なるが分子Aファミリーに属し同様の立体構造を持った分子Cのアゴニスト・アンタゴニストとしても働くものが得られる。

このような方法を用いることにより、補助刺激シグナルに関与したCD80及びCD86とCD28及びCTLA-4、さらにこれらの分子と立体構造が非常に類似しているが未だ明らかになっていない分子をターゲットにした免疫系を制御するような小分子をアミノ酸一次配列に依存せずに作製することが可能になり、本発明の一つであるT細胞を活性化を促進するペプチド配列を得るに至った。

本発明の免疫制御分子とは、第一シグナルに続く補助刺激シグナルに関与した分子をターゲットにした小分子である。ここでいう補助刺激シグナルに関与した分子とは、APC上に発現するCD80及びCD86と、そのカウンターレセプターであるT細胞上に発現するCD28及びCTLA-4、あるいは未だ知られていないがこれらの分子と非常に立体構造がよく似ている分子である。本発明の免疫制御分子は、第一シグナルに続く補助刺激シグナルに関与した分子間の結合を阻止し、かつその分子の立体構

造を認識するモノクローナル抗体を用いて、 10^8 種類以上の少なくとも8個以上の長さを持ったランダムなペプチド配列を提示するファージランダムペプチドライブラリーを、そのペプチド配列がファージに表現された状態でスクリーニングすることによって得ることができる。

本発明の免疫制御分子は、補助刺激シグナルに関与し、かつT細胞上に発現するCTLA-4に対する抗体と結合するものであり、さらに、そのアミノ酸配列としての特徴は、2つのCys残基を持ち、該Cys残基を介して分子内S-S結合をしており、これら2つのCys残基間に少なくとも6個のアミノ酸からなる配列を含む、全体では少なくとも8個のペプチド配列からなる分子である。また、当該分子はCTLA-4分子のアミノ酸配列とはホモロジーがほとんど無いという特徴がある。

本発明の免疫制御分子の代表例としては、配列表の配列番号4に記載したF2または配列番号8に記載したF6が挙げられる。

本発明の免疫制御分子は、ファージクローンより得たF2及びF6のペプチド配列情報に基づきその立体構造を保持した状態であれば、何らかのキャリアー上か、あるいは蛋白質に組み込まれた形態であるか、またはペプチド合成によりペプチド単独の形態でも使用可能である。さらに、F2またはF6をリード化合物として、F2またはF6の立体構造が保持された範囲で当該ペプチド配列を欠失、置換、付加または修飾させてもよい。

本発明で用いるモノクローナル抗体は、補助刺激シグナルに関与した分子間の結合を阻害する能力のある抗体であればどのような動物種の抗体でもよく、抗体のサブクラスやアイソタイプには限定されないが、コンフォメーションナルエピトープを認識する抗体が望ましい。本発明ではT細胞上に発現するCTLA-4に対する抗CTLA-4抗体として、UC10-4F10-11モノクローナル抗体（ファーマンジェン社製）を使用して

いるが、これに限定されるものではない。例えば、抗CD28抗体など、CTLA-4及びCD80またはCD86との結合、あるいはCD28及びCD80またはCD86との結合を阻害することができ、かつコンフォメーションナルエピトープを認識するモノクローナル抗体であれば使用することができる。コンフォメーションナルエピトープを認識する抗体とは、エピトープの立体構造を認識する抗体、すなわち、その抗体の抗原結合領域がカウンターパートの立体構造を再現しているような抗体をいう。具体的には免疫沈降反応など抗原がネイティブな状態であれば結合できるが、抗原が変性状態ある場合に結合できない抗体のことであり、還元下の状態でウエスタンブロッティング法により抗原と結合できない抗体、またはエピトープの構成アミノ酸配列をもとに合成されたリニアなペプチドに結合できないような抗体のことを指す。

本発明で用いるファージランダムペプチドライブラリーは、ファージ表面にランダム配列を持つペプチドが提示されているものならば、いかなる種類のファージベクターも使用可能である。挿入されるランダムなペプチド配列の長さは、8個以上のアミノ酸のランダム配列が挿入されたものを用いるのが好ましく、15個以上のアミノ酸のランダム配列が挿入されたものがさらに好ましい。さらに、ランダムなペプチド配列はファージの表面に提示されていれば、いかなるファージの構成タンパク質に挿入されていてもよいが、pⅢ分子に挿入されたものが好ましい。pⅢ分子のN末端から4番目のAlaと5番目のGlyとの間（配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列において、それぞれ22番目と23番目に相当する）に15個以上のアミノ酸のランダム配列が挿入されているものならばペプチドモチーフの両端に延びるアミノ酸配列がモチーフの三次構造に及ぼす影響を最小限に抑えることができる。

本発明は、前述の抗CTLA-4抗体を用いて、ファージランダムペプチドライブラリーをスクリーニングすることから開始する。スクリーニング法としては抗体をプレート上に固定化して使用する一般的なパンニング方法や、抗体を固定化したアフィニティークラム法などを使用することができる。また、パンニング→ファージ回収→ファージ増殖→パンニングの工程を3回以上繰り返すことによって、目的のファージクローンを濃縮することができる。このようなスクリーニング法によって、抗CTLA-4抗体に結合するペプチド配列を持ったファージクローンを得ることができる。通常このようにして得られたファージクローンは、抗体との結合力の差や保持されているペプチド配列の種類によっていくつかのクローン集団に分類することができる。ファージクローンのシーケンスはジデオキシ法などの常法により簡単に行うことができる。

次に、これらの分類されたクローンの中から、T細胞制御活性があるペプチド配列を選択するために、*in vitro*あるいは*in vivo*のアッセイ系によって更なるスクリーニングをする必要がある。例えば、抗CTLA-4抗体によって選ばれたファージクローンは、CTLA-4分子と同様の働きをすることが期待されているので、CTLA-4分子のカウンターレセプターであるCD80あるいはCD86と結合するかどうか調べることができるアッセイ系により選別することができる。また、補助刺激シグナルが関与する分子が相互作用した結果を実際の免疫反応によって調べることが可能なバイオアッセイ系によりファージを選択することもできる。この場合のバイオアッセイ系とは、T細胞の活性化の程度がわかる方法であれば、どのような方法でもよく、T細胞活性化の結果、産生されるサイトカインの量を調べる方法なども適用可能である。抗原により一回感作された動物のT細胞や抗原提示細胞を*in vitro*でペプチド配列を持つファージクロー

ン単独であるいは、抗原及びペプチド配列を持つファージクローンと共に刺激し、T細胞の活性化の程度を³Hチミジンの取り込み度合いで調べる方法が好ましい。分類されたファージクローンを、このような実際の免疫反応を反映したアッセイ系に供することにより、結果として現在知られていないメカニズムにより、T細胞を制御するようなペプチド配列を持ったファージクローンが得られる可能性がある。そのような望ましい例として、F 6のアミノ酸からなるペプチド配列（配列表の配列番号8）が示される。このF 6配列を持ったファージは、未だ知られていないが、おそらくCD 80あるいはCD 86とよく似た他の免疫関連因子と相互作用していると思われる。このようなペプチド配列をスクリーニングするためには、ペプチドがファージ上に表現されたままでアッセイに供することが望ましい。立体構造が重要であるようなペプチド配列の場合、ファージ上から遊離のペプチド状態にすると、その立体構造が保持できない場合が多い。しかし、ファージクローンより得たペプチド配列情報に基づきその立体構造を保持した状態でペプチドを合成することができるならば、前述のスクリーニング系にペプチド単独で供することも可能である。

このような方法により、CD 80あるいはCD 86分子に結合し、さらにT細胞を活性化するペプチド配列を持ったファージクローンを得ることができる。その好ましい配列はF 2（配列表の配列番号4）である。また、CD 80やCD 86分子とは結合しないが、T細胞を活性化するペプチド配列を持ったファージクローンも得ることができる。その望ましい配列はF 6（配列表の配列番号8）である。

本発明の免疫制御分子は、補助刺激シグナルに関与した分子の発現状態により、T細胞に対して正の制御または負の制御を行うことができる。例えばCD 28が主として作用している状態では、その免疫制御分子は免疫

反応抑制因子として働くことができ、一方、CTLA-4が主として作用している状態では、免疫反応活性化因子として働くことができる。例えば、本発明のF2またはF6に代表される免疫制御分子は、T細胞の抗原特異的な活性化を著しく（5～10倍）促進することが可能である。

また、その免疫制御分子による制御活性は、抗原の種類に依存するものではなく、当該分子と同時に免疫反応の場に存在するものであればいかなる抗原に対する免疫反応をも制御することができる抗原非特異的なものである。さらに、その制御活性を発揮するためには、抗原と同一分子上に存在してもよいが、抗原と個別に使用されてもよい。

本発明の補助刺激シグナルに関与した分子間の相互作用を制御する免疫制御分子は、結果として免疫反応を制御することができることから、免疫反応に係わる疾病には全て応用可能である。最も好ましい使用方法としては、ワクチンあるいは、ガンの抗原特異的な免疫療法における免疫反応増強剤やアレルギー反応における免疫抑制剤としての使用などが挙げられる。

また本発明は、補助刺激シグナルに関与した分子以外に、一般的なレセプター分子とそれに相互作用するリガンド分子あるいは、酵素分子と基質蛋白質等の生体高分子間の相互作用を制御する小分子を設計するための新しい方法をも提供する。生体高分子間の結合を制御する小分子を、アミノ酸一次配列に依存せずに直接分子設計することができる本発明は、レセプターとリガンドのアゴニストやアンタゴニストを分子デザインする上で有用な方法となる。この方法はすべての生体高分子に適用できるので、この新技術で明らかにされるであろう数々のペプチドモチーフは、今後の新規医薬品の開発に絶大な波及効果をもつと考えられる。しかも、波及効果は単に医薬品開発に留まらず、選択的接着技術を必要とする医療材料、ドラッグデリバリーシステム（DDS）等の機能性材料分野の開拓、さらに分子

間の特異的結合を利用する応用技術一般にも及ぶものと考えられる。

実施例

つぎに、本発明を実施例に基づいてさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限られるものではない。

実施例 1：ファージランダムペプチドライブラリー

Smithら (G. P. Smith, Science, Vol. 249, p 386-390 (1990)) により報告されたファージランダムペプチドライブラリーは、産生されるファージの先端にあるpⅢタンパク分子をコードする遺伝子 (geneⅢ) 内に目的に応じた長さのペプチド配列に相当するランダムな遺伝子を挿入したものであり、pⅢタンパクは感染能力を保持したままでそのペプチド分子を含んだ形で発現するように設計されたものである。配列表の配列番号1にpⅢタンパクのアミノ酸の一次配列を示した。この一次配列の22番目のAlaと23番目のGlyの間にランダムなアミノ酸配列に対応する遺伝子を挿入することで、このペプチドはpⅢタンパクと融合した形で発現する。この方法を用いると、数億種類にも及ぶペプチドの集合体を化学反応で合成するよりも容易に得られ、さらに必要に応じてその増幅が可能である。今回のスクリーニングに用いたファージランダムペプチドライブラリーはNishi、Sayaら (T. Nishi 実験医学、Vol. 11、p 95-100 (1993)) が作製したもので、これはSmithらによって報告された方法により作製されたものである。このファージランダムペプチドライブラリーは、その先端にあるpⅢタンパク分子をコードする遺伝子 (geneⅢ) 内の、配列表の配列番号1の22番目のAlaと23番目のGlyの間に15残基のランダムなアミノ酸配列に対応する遺伝子が挿入されて、pⅢタンパクとこの15残基のアミノ酸が融合した形で発現するように設計されたものである。この15残基のランダムなペプチド分子を

ファージのpⅢタンパク内に発現するファージ (fd-tet) を今回のスクリーニングに用いた。

実施例 2 : スクリーニングに用いる抗体の活性

本発明の目的は、CD80とCTLA-4あるいはこれらの分子と関連する分子と相互作用して免疫調節作用を示すペプチド配列をもつファージクローンを得ることである。そこで実施例1に示したファージランダムペプチドライブラリーのスクリーニングを、抗マウスCTLA-4モノクローナル抗体 (ファーミンジェンより購入: UC10-4F10-11) を用いて、この抗体に特異的に結合するファージクローンの単離を行った。この抗体に特異的に結合するファージのpⅢに含まれる15残基のモチーフは、CTLA-4分子の抗体に認識される部分と同様な構造を持っていると考えられる。この部分はリガンドへの相互作用部位であるのでファージより得られたモチーフもCD80分子またはCD86分子を認識し、CTLA-4分子とCD80分子またはCD86分子との相互作用に影響を与えるか、あるいはCD80分子またはCD86分子に何らかのシグナルを伝える可能性がある。

まず、スクリーニングに用いたこの抗体の特異性を調べるために、以下の操作を行った。この操作で用いたCTLA-4-Ig及びCD80-Igキメラ分子は、Linsleyら (J. Exp. Med. Vol. 174, p 561-569 (1991)) の方法に従って作製したCTLA-4-Ig及びCD80-Igのキメラ遺伝子断片をpCDM8に組み込んだ発現プラスミド (上掲 (北大免疫研) より恵与) を、それぞれDEAE-デキストラン法を用いてCOS7細胞に遺伝子導入後、培養72時間後の上清よりプロテインAセファロース (ファルマシア社) を用いて精製したものを使用した。

まず96ウェルのEIAプレート (住友ベークライト、東京) に0.0

2% NaN_3 を含む50mMトリス-HCl、pH7.5、150mM NaCl (TBS) で希釈したCTLA-4-Ig (200ng/ml) を1ウエルあたり50 μ l分注し、37℃で1時間反応後、0.5% Tween 20を含む50mMトリス-HCl、pH7.5、150mM NaCl (TBST) で洗浄した。各ウエルに1%牛血清アルブミン (BSA) を250 μ l分注し、37℃で1時間反応させてマスキングを行った。各ウエルをTBSTで洗浄後、TBSで種々の濃度に希釈した抗マウスCTLA-4モノクローナル抗体を1ウエルあたり100 μ l分注し、37℃で1時間反応後、TBSTで洗浄した。その後TBSで200ng/mlに希釈したビオチン標識したマウスCD80-Igを1ウエルあたり50 μ l分注し、37℃で1時間反応後、TBSTで洗浄した。最後にTBSで100倍に希釈したアルカリフォスタファアーゼ標識ストレプトアビジン

(Leinco Technologies Ltd., ミズーリ) を室温で1時間反応、TBSTで洗浄後、基質であるp-ニトロフェニルリン酸ナトリウム六水和物 (和光純薬、大阪) を加え吸光度405nmを測定した。陰性対照として抗マウスCTLA-4モノクローナル抗体の代わりにこの抗体と同じアイソタイプであるハムスター抗体 (ハムスター血清の硫酸アンモニウム (33~55%) 飽和画分をPBSに対して透析したもの) を用いた。その結果、図1に示すように、ここで用いた抗マウスCTLA-4モノクローナル抗体はCTLA-4-IgとCD80-Igの結合を完全に阻害することを確認した。

実施例3 : 抗CTLA-4抗体と結合するファージクロンのパンニング

実施例2に示したCTLA-4-IgとCD80-Igの結合を阻害する抗CTLA-4抗体を用いて、以下に示す方法に従って実施例1に述べたファージランダムペプチドライブラリーのパンニングを行った。直径3

5 mmのプラスチックプレート（岩城ガラス、東京）に抗マウスCTLA-4モノクローナル抗体を1枚あたり $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を 1ml コートし、ファージランダムペプチドライブラリー（ $1.2 \times 10^{12}\text{TU}$ ）と 4°C で16時間反応させた。このプレートをTBSTで洗浄後、結合しなかったファージを取り除き、 0.1N HCl -グリシン、 $\text{pH} 2.2$ （ $1\text{mg}/\text{ml}$ BSA、 $0.1\text{mg}/\text{ml}$ フェノールレッド（ギブコ、ニューヨーク））を加え、抗マウスCTLA-4モノクローナル抗体に特異的に結合したファージを溶出し、回収後、 $\text{pH} 9.1$ のトリス-HClで中和した。得られたファージを大腸菌K91 kanに感染させ増殖させた後、パンニングに用いる抗マウスCTLA-4モノクローナル抗体の量を $5\mu\text{g}$ 、 $1\mu\text{g}$ と減らしながら同じ操作を計3回行い、より強く特異的に抗マウスCTLA-4モノクローナル抗体と結合するファージの選別を行った。

得られたファージ58個のクローンについてELISA法を用いた一次スクリーニングを行った。Smithらの方法（G. P. Smith Method in Enzymology Vol. 217 p 228-257（1993）、アカデミックプレス）に従い精製した各ファージ（ 4×10^9 ビリオン/ウエル/ $40\mu\text{l}$ ）を96ウエルELISAプレート（住友ベークライト、東京）に 4°C で1晩でコートし、TBSTで洗浄し、 $0.02\%\text{NaN}_3$ 、 $1\%\text{BSA}$ を含む 50mM トリス-HCl、 $\text{pH} 7.5$ 、 150mM NaCl を1ウエルあたり $100\mu\text{l}$ 加え、室温で2時間ブロックした。このプレートをTBSTで洗浄後、抗マウスCTLA-4モノクローナル抗体（ $200\text{ng}/\text{ml}$ /ウエル/ $100\mu\text{l}$ ）を加え室温で1時間反応させた。TBSTで洗浄後、TBSTで250倍に希釈したアルカリフォスタファーズ標識の抗ハムスターIgG抗体（ザイメット、カリフォルニア）を室温で1時間反応、洗浄後、基質であるp-ニトロフェニルリン酸ナトリウム六水和物（和光

純薬、大阪)を加え、405nmにおける吸光度を測定した。その結果、抗マウスCTLA-4モノクローナル抗体と反応するファージクローンが21個確認できた(図2)。

実施例4：パンニングされたファージクローンの挿入ペプチドのアミノ酸配列の決定

実施例3で得られた21個のファージクローンの挿入ペプチドに対応する核酸塩基配列について、それぞれのファージからDNAをSmithらの方法(G. P. Smith, Method in Enzymology, Vol. 217, p 228-257(1993)、アカデミックプレス)に従って回収し、配列表の配列番号2に示す合成DNAをプライマーとして、Applied Biosystems社の373A-36S DNAシーケンサーを用いて核酸塩基配列の解析を行った。このプライマーは配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列の37番のProから41番のAsnの領域に対応するものである。核酸塩基配列の解析の結果、これらのファージクローンの、配列表の配列番号1に示すpⅢタンパクの22番目のAlaと23番目のGlyの間に含まれるアミノ酸配列モチーフは、配列番号3から8に示す6種類のアミノ酸配列に分類されることが確認された。これらのアミノ酸配列をCTLA-4のアミノ酸配列と比較したが、ホモロジーは認められなかった。これらのアミノ酸配列のモチーフを表1に示す。これらのアミノ酸配列モチーフを、それぞれF1(配列番号3)、F2(配列番号4)、F3(配列番号5)、F4(配列番号6)、F5(配列番号7)及びF6(配列番号8)とし、以下の解析を行った。

表 1

F 1 : Gly Leu His Ser Arg Cys His Ile Gly Arg Asp Cys Ser Ser Ala
 F 2 : Gly Phe Val Cys Ser Gly Ile Phe Ala Val Gly Val Gly Arg Cys
 F 3 : Ser Cys Val Phe His His Ser Gly Arg Tyr Trp Gly Arg Cys Val
 F 4 : His Tyr Gly Asp Cys Arg Tyr Asp Leu Gly Ser Cys Arg Gly Ala
 F 5 : Ala Cys Val Met Tyr Asp Phe Val Leu Arg Gly Met Cys Ala Arg
 F 6 : Ala Pro Gly Val Arg Leu Gly Cys Ala Val Leu Gly Arg Tyr Cys

実施例 5 : 各モチーフと抗マウス C T L A - 4 モノクローナル抗体との結合特異性

実施例 4 に示したそれぞれのモチーフが、特異的に抗マウス C T L A - 4 モノクローナル抗体に結合するかどうかについての検討を行った。特異性の検討は実施例 3 に示した E L I S A 法により行った。陰性コントロールとして抗マウス C T L A - 4 モノクローナル抗体と同じアイソタイプである抗マウス C D 2 8 抗体（ファーミンジェン、サンジエゴ）およびハムスター I g G を用いた。検出抗体には抗ハムスター I g G 抗体を用いた。その結果、F 2 配列を発現するファージと F 6 配列を発現するファージがより強く抗マウス C T L A - 4 モノクローナル抗体と反応し、F 1 配列、F 4 配列及び F 5 配列を発現する各ファージは弱く反応することがわかった。また、F 3 配列を発現するファージはさらに弱く反応した（図 3）。なお、この F 2 配列を発現するファージを産生する大腸菌が *Escherichia coli* F 2 [F E R M B P - 6 0 0 9] として、また、F 6 配列を発現するファージを産生する大腸菌が *Escherichia coli* F 6 [F E R M B P - 6 0 1 0] として、1997 年 4 月 1 4 日（原寄託日；1997 年 7 月 4 日にそれぞれ微工研菌寄第 P - 1 6 1 9 2 号および第 P - 1 6 1 9 3 号よりブダペスト条約に基づく寄託へ移管）に通商産業省工業技術院生命工

学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305））に出願人により寄託されている。

実施例6：各々のファージのT細胞増殖刺激活性

実施例5に示したように、今回得られた6種類の配列を発現するファージは、抗マウスCTLA-4モノクローナル抗体と結合活性を有することから、これらの配列を発現するファージは、アミノ酸配列は類似していないが、CTLA-4分子のホモログとして、CTLA-4分子と同様の働きをすることが期待される。そこで、まずT細胞増殖に及ぼすこれらのファージの影響をマウスを用いて検討した。

実験にはBalb/cマウス（6週令）を用い（1群4匹）、ファージはSmithらの方法（G. P. Smith, Method in Enzymology, Vol. 217、p 228-257（1993）、アカデミックプレス）に従って精製した。ファージの量は、プロテインアッセイキット（バイオラド）を用いて牛血清アルブミンをスタンダードとして測定し、タンパク濃度で表した。

まず、Balb/cマウスに対する抗原刺激として、pⅢタンパクを発現していないファージ本体（W. T.）を $10\mu\text{g}$ （ $200\mu\text{l}$ /PBS）腹腔内投与した。投与4週間後に各マウスより常法に従って脾臓細胞を摘出し、この脾臓細胞を96ウェルカルチャープレートに1ウェルあたり 1.5×10^5 細胞分注し、精製したW. T. のファージおよびF1～F6の配列を発現するファージを最終濃度 0.015 から $5\mu\text{g/ml}$ になるように加え、計 $200\mu\text{l}$ （10%FCSを含むRPMI 1640培地）とし、各サンプルについて3検体ずつ用意した。これらの試料を30分間氷上でインキュベート後、3日間 37°C 、5% CO_2 の条件で培養を行った。培養終了18時間前に $[\text{}^3\text{H}]$ チミジン（ $0.5\mu\text{Ci/well}$ ）でパルスラベルを行い、セルハーベスターで細胞を回収し、 $[\text{}^3\text{H}]$ チミジンの取り込み量を液体シンチ

レーションカウンターで測定した。その結果、図4に示すようにT細胞の増殖は、F1、F3、F4、F5配列を発現するファージを加えた群は、W. T. ファージを加えた群と同程度の活性しか認められなかったが、F2およびF6配列を発現するファージを加えた群は、W. T. ファージを加えた群と比べて5倍から10倍のT細胞の著明な増殖が認められた。以上のことからF2及びF6配列を発現するファージにはT細胞の抗原特異的な増殖刺激活性があることが示された。

実施例7：F2及びF6配列を有するファージのマウスCD80への結合活性

実施例5でT細胞増殖刺激活性を示した、F2及びF6配列を発現するファージのCTLA-4のレセプターであるマウスCD80に対する結合活性を調べた。

結合活性の評価はELISA法を用いた。F2およびF6配列を発現するファージ（ 4×10^9 ビリオン/ウエル/ $40 \mu\text{l}$ ）を96ウエルELISAプレート（住友ベークライト、東京）に 4°C で1晩でコートし、1% BSAを含む50 mM トリス-HCl、pH 7.5、150 mM NaCl（TBS）で室温で2時間ブロックした。このプレートをTBSTで洗浄後、PBSで希釈したマウスCD80-Igを200 ngから1000 ng/ $35 \mu\text{l}$ 加え、室温で1時間反応させた。TBSTで洗浄後、TBSで100倍に希釈したアルカリフォスタファーズ標識の抗ヒトIgG抗体（ザイメット、カリフォルニア）を室温で1時間反応、洗浄後、基質であるp-ニトロフェニルリン酸ナトリウム六水和物を加え吸光度405 nmを測定した。その結果、F2配列を発現するファージのみがマウスCD80-Igに濃度依存的に結合することが確認された（図5）。

次にこのF2ファージのCD80-Igへの結合の特異性をみるために、

F 2 配列を発現するファージをコートしたプレートに対してマウスCD 8 0-I g、マウスCTLA-4-I g、ヒトIg Gとの反応を、本実施例に述べた方法に従ってELISA法により検討を行った。その結果、F 2 配列を発現するファージはマウスCD 8 0-I gのみ特異的に反応することが確認できた(図6)。

実施例8：F 2 配列を発現するファージのヒトCD 8 0-I gとの結合性

実施例7ではF 2 ファージがマウスCD 8 0-I gと特異的に結合することを示したが、次に、このF 2 配列を発現するファージがヒトCD 8 0-I gと特異的に結合するかどうかを、実施例7、図5に示した方法に従って検討した。ヒトCD 8 0-I gの調製にあたっては、Linsleyらの方法(J. Exp. Med. Vol. 173、p 721-730(1991))に従って、ヒトCD 8 0の細胞外ドメインとヒトIg C γ 1領域との融合遺伝子を構築した。この融合遺伝子断片がpCDM8に組み込まれた発現プラスミドを、DEAE-デキストラン法を用いてCOS7細胞に遺伝子導入後、培養72時間後の上清よりプロテインAセファロース(ファルマシア社)を用いてヒトCD 8 0-I gを精製した。このようにして調製したヒトCD 8 0-I gを用い、F 2 配列を発現するファージのヒトCD 8 0-I gへの結合活性を、マウスCTLA-4-I g及びヒトIg Gを陰性対照として調べたところ、図7に示すように、F 2 配列を発現するファージはマウスCD 8 0-I gと同様にヒトCD 8 0-I gと特異的に結合することが確認された。この結果は、F 2 配列を発現するファージは、ヒトの免疫系にも作用しうることを示している。

実施例9：鶏卵リゾチーム免疫マウスに対するF 2 及びF 6 配列を発現するファージのT細胞増殖刺激活性

実施例6でF 2 及びF 6 配列を発現する各ファージがT細胞増殖刺激活

性を有することを示した。実施例6では、最初の抗原刺激としてファージタンパクを用い、in vitroの二次刺激ではこのファージタンパクにF 2あるいはF 6配列が発現したものをを用いた。つまり実施例6では、抗原としてファージタンパク質を用い、二次刺激の際に、この抗原とF 2あるいはF 6配列が同じ粒子上に存在する状態で行われた。そこで、今回認められたF 2あるいはF 6配列を発現するファージのT細胞増殖刺激活性を、最初の抗原刺激として、ファージとは全く異なる抗原（鶏卵リゾチーム）を用い、二次刺激として、鶏卵リゾチームとF 2あるいはF 6配列を発現するファージ粒子を個別に加える系で実施例6と同様の検討を行った。

まずBalb/cマウスに対して鶏卵リゾチームを $10\mu\text{g}$ ($100\mu\text{l}$ /フロイント不完全アジュバント(F I A)) 皮下注射した。投与4週間後に各マウスより常法に従って脾臓細胞と所属リンパ節を摘出した。本実施例ではこの脾臓細胞を調製後96ウェルカルチャープレートに1ウェルあたり 1.5×10^5 細胞に分注し、各サンプルに鶏卵リゾチームを $3\mu\text{g/ml}$ で添加し、F 2及びF 6配列を発現するファージを添加する時期を（各ファージの添加量は $1\mu\text{g/ml}$ ）、鶏卵リゾチーム添加と同時、1日後、2日後の3通りに設定した。陰性対照として、W. T. ファージを添加した。培養以降の測定は実施例6に従った。その結果、図8に示すように、最初の抗原刺激はファージ由来の抗原でなくても（この場合は鶏卵リゾチーム）、F 2及びF 6配列を発現するファージは、T細胞の抗原特異的な増殖刺激活性を示した。しかもこの活性は、抗原と同一分子上になくとも作用し、抗原と同時に添加する方が効果が高いことが示された。

実施例10：T細胞増殖刺激活性におけるF 2及びF 6配列を発現する各ファージのレセプター特異性

F 2及びF 6配列を発現する各ファージは、実施例5に示すように、抗

マウスCTLA-4モノクローナル抗体と反応し、そのうちF2配列を発現するファージは、実施例7に示すようにマウスCD80-Igと特異的に結合する。そこで実施例9に示されたF2及びF6配列を発現する各ファージのT細胞増殖刺激活性が、これらのレセプター-リガンドを介した反応の結果かどうかを調べるために、実施例9で述べたF2及びF6配列を発現する各ファージのT細胞増殖刺激活性に対する、CD80-Ig、CD86-Igの影響を測定した。

Balb/cマウスに対して鶏卵リゾチームを50 μ g(100 μ l/PBS)腹腔内投与し、投与4週間後各マウスより常法に従って脾臓細胞を摘出した。本実施例では、この脾臓細胞を96ウェルカルチャープレートに 1.5×10^5 細胞に分注し、各サンプルに鶏卵リゾチーム3 μ g/mlとF2あるいはF6配列を発現しているファージ(1 μ g/ml)とCD80-IgまたはCD86-Igまたは陰性対照としてヒト-Igを0から1 μ g/mlで添加し、実施例6で述べた方法に従ってT細胞増殖刺激活性を調べた。

その結果、図9に示すようにF2配列を発現するファージは、CD80-Ig存在下では著しくT細胞増殖刺激活性が阻害され、CD86-Ig存在下では、CD80-Igの場合の40%程度の阻害が認められた。Makらの報告によると、CTLA-4遺伝子をノックアウトしたマウスではT細胞の過剰な活性化がおこり、生後3~4週間で死亡することから

(Science Vol. 270, p985(1995))、CTLA-4分子がT細胞の活性化を抑制する機能を有していることが示唆されている。Makらの報告に従えば、今回得られた結果は、F2配列を発現するファージがCD80或いはCD86とCTLA-4の相互作用に影響した結果、T細胞増殖を誘導したことを示唆している。このように、F2配列を発現するファージが、CTLA-4分子のT細胞の活性化に対する負の作用を阻害した

可能性や、CD80 或いはCD86 と結合することでAPCを介してT細胞の活性化に対して正のシグナルを与えた、などの可能性が考えられる。

一方、同様の実験をF6配列を発現するファージで行ったところ、図10に示すようにCD80-IgあるいはCD86-Igを添加しても全くT細胞増殖刺激活性が阻害されず、F6配列を発現するファージはこれらのレセプター-リガンドとは別の分子を介してT細胞増殖刺激活性を示しているものと思われる。これは、今回のように抗リガンド抗体を用いてファージランダムペプチドライブラリーのスクリーニングを行うことで、目的のリガンドと似た未知のリガンド或いはレセプター様の分子と相互作用するファージが得られることを示しており、未知のリガンド或いはレセプターのスクリーニングに有効であることを示している。

実施例11：B型肝炎表面抗原（HBsAg）免疫マウスに対するF2またはF6配列を発現するファージの抗HBsAg抗体産生増強活性

実施例9において、F2またはF6配列を発現するファージが、鶏卵リゾチーム免疫マウスに対してT細胞増強刺激活性を有することが示され、F2またはF6配列を発現するファージが外来抗原に対しても免疫系の細胞を活性化することが明らかになった。そこで、次に、この免疫系の細胞の活性化がワクチン抗原を免疫した際にも認められるかどうかをB型肝炎表面抗原（HBsAg）を用いて検討を行った。

まず、Balb/cマウス（4匹／1群）に対して、酵母産生組換えHBsAg（yHBsAg；（財）化学及血清療法研究所）を $10\mu\text{g}$ （ $100\mu\text{l}$ /PBS）のみ、またはyHBsAgとともにF2またはF6配列を発現するファージ（ $10\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ ）を腹腔内投与した。さらに初回免疫より15日後に、同じ組み合わせのサンプルを腹腔内投与した。初回免疫より3週間後各マウスより採血を行い、血清をPBSで50倍、20

0倍、800倍希釈した後、抗HBsAg抗体価をオーサブEIAキット（アボット社）を用いて測定した。

抗体価の定量は、キットに添付された陽性コントロールをスタンダードとして用いて行った。その結果、図11に示すように、HBsAgのみを免疫した群が示した抗HBsAg抗体価を1とした場合、F2またはF6配列を発現するファージと共にyHBsAgを免疫した群は、3週間後の血中の抗HBsAg抗体価はそれぞれ17.9および11.9であり、有意に高かった。この結果より、F2またはF6配列を発現するファージがアジュバント活性を有することが明らかとなった。

配 列 表

配列番号 : 1

配列の長さ : 4 3 2

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1 本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

起源

生物名 バクテリオファージ (fd-tet)

配列

Val Lys Lys Leu Leu Phe Ala Ile Pro Leu Val Val Pro Phe Tyr Ser

5

10

15

His Ser Ala Asp Gly Ala Gly Ala Ala Gly Ala Glu Thr Val Glu Ser

20

25

30

Cys Leu Ala Lys Pro His Thr Glu Asn Ser Phe Thr Asn Val Trp Lys

35

40

45

Asp Asp Lys Thr Leu Asp Arg Tyr Ala Asn Tyr Glu Gly Cys Leu Trp

50

55

60

Asn Ala Thr Gly Val Val Val Cys Thr Gly Asp Glu Thr Gln Cys Tyr

65

70

75

80

Gly Thr Trp Val Pro Ile Gly Leu Ala Ile Pro Glu Asn Glu Gly Gly

85

90

95

Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly

100

105

110

Thr Lys Pro Pro Glu Tyr Gly Asp Thr Pro Ile Pro Gly Tyr Thr Tyr

115

120

125

Ile Asn Pro Leu Asp Gly Thr Tyr Pro Pro Gly Thr Glu Gln Asn Pro

130

135

140

Ala Asn Pro Asn Pro Ser Leu Glu Glu Ser Gln Pro Leu Asn Thr Phe

145

150

155

160

Met Phe Gln Asn Asn Arg Phe Arg Asn Arg Gln Gly Ala Leu Thr Val

165

170

175

Tyr Thr Gly Thr Val Thr Gln Gly Thr Asp Pro Val Lys Thr Tyr Tyr

180

185

190

Gln Tyr Thr Pro Val Ser Ser Lys Ala Met Tyr Asp Ala Tyr Trp Asn

195

200

205

Gly Lys Phe Arg Asp Cys Ala Phe His Ser Gly Phe Asn Glu Asp Pro

210

215

220

Phe Val Cys Glu Tyr Gln Gly Gln Ser Ser Asp Leu Pro Gln Pro Pro

225

230

235

240

Val Asn Ala Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu

245

250

255

Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly

260

265

270

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Asp Phe Asp Tyr Glu Lys

275

280

285

Met Ala Asn Ala Asn Lys Gly Ala Met Thr Glu Asn Ala Asp Glu Asn

290

295

300

Ala Leu Gln Ser Asp Ala Lys Gly Lys Leu Asp Ser Val Ala Thr Asp

305

310

315

320

Tyr Gly Ala Ala Ile Asp Gly Phe Ile Gly Asp Val Ser Gly Leu Ala

325

330

335

Asn Gly Asn Gly Ala Thr Gly Asp Phe Ala Gly Ser Asn Ser Gln Met

340

345

350

Ala Gln Val Gly Asp Gly Asp Asn Ser Pro Leu Met Asn Asn Phe Arg

355

360

365

Gln Tyr Leu Pro Ser Leu Pro Gln Ser Val Glu Cys Arg Pro Tyr Val

370

375

380

Phe Gly Ala Gly Lys Pro Tyr Glu Phe Ser Ile Asp Cys Asp Lys Ile

385

390

395

400

Asn Leu Phe Arg Gly Val Phe Ala Phe Leu Leu Tyr Val Ala Thr Phe

405

410

415

Met Tyr Val Phe Ser Thr Phe Ala Asn Ile Leu Arg Asn Lys Glu Ser

420

425

430

配列番号：2

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列

TGAATTTTCT GTATGAGG 18

配列番号：3

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他のペプチド（人工ペプチド）

配列

Gly Leu His Ser Arg Cys His Ile Gly Arg Asp Cys Ser Ser Ala

1 5 10 15

配列番号：4

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他のペプチド（人工ペプチド）

配列

Gly Phe Val Cys Ser Gly Ile Phe Ala Val Gly Val Gly Arg Cys

1 5 10 15

配列番号 : 5

配列の長さ : 15

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他のペプチド (人工ペプチド)

配列

Ser Cys Val Phe His His Ser Gly Arg Tyr Trp Gly Arg Cys Val

1 5 10 15

配列番号 : 6

配列の長さ : 15

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他のペプチド (人工ペプチド)

配列

His Tyr Gly Asp Cys Arg Tyr Asp Leu Gly Ser Cys Arg Gly Ala

1 5 10 15

配列番号 : 7

配列の長さ : 15

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他のペプチド (人工ペプチド)

配列

Ala Cys Val Met Tyr Asp Phe Val Leu Arg Gly Met Cys Ala Arg

1 5 10 15

配列番号 : 8

配列の長さ : 15

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 1本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他のペプチド (人工ペプチド)

配列

Ala Pro Gly Val Arg Leu Gly Cys Ala Val Leu Gly Arg Tyr Cys

1 5 10 15

請 求 の 範 囲

1. 抗原提示細胞によるT細胞活性化において、抗原提示細胞上及び／またはT細胞上の補助刺激シグナルの伝達に関与する分子に相互作用することにより補助刺激シグナルの伝達を制御する免疫制御分子。

2. 当該補助刺激シグナルの伝達に関与する分子に対するモノクローナル抗体により認識される、請求項1記載の免疫制御分子。

3. 当該補助刺激シグナルに関与する分子が細胞障害性Tリンパ球関連抗原4（CTLA-4）であり、当該モノクローナル抗体が抗CTLA-4モノクローナル抗体である、請求項1または2に記載の免疫制御分子。

4. 当該補助刺激シグナルの伝達に関与する分子がCD28であり、当該モノクローナル抗体が抗CD28モノクローナル抗体である、請求項1または2に記載の免疫制御分子。

5. 当該補助刺激シグナルの伝達に関与する分子がCD80であり、当該モノクローナル抗体が抗CD80モノクローナル抗体である、請求項1または2に記載の免疫制御分子。

6. 当該補助刺激シグナルの伝達に関与する分子がCD86であり、当該モノクローナル抗体が抗CD86モノクローナル抗体である、請求項1または2に記載の免疫制御分子。

7. 2個のシステイン（Cys）残基を有し、当該システイン残基はCys-Cys結合を形成しており、かつ当該Cys-Cys結合間に少なくとも6個のアミノ酸からなる配列を有するペプチドを含有する、請求項1または2に記載の免疫制御分子。

8. 当該ペプチドが配列表の配列番号4に記載のペプチドであり、少なくともアミノ酸番号4番目から15番目の配列を有する、請求項7に記載の免疫制御分子。

9. 当該ペプチドが配列表の配列番号 4 に記載のペプチドを有する、請求項 7 または 8 に記載の免疫制御分子。

10. 当該ペプチドが配列表の配列番号 8 に記載のペプチドであり、少なくともアミノ酸番号 8 番目から 15 番目の配列を有する、請求項 7 に記載の免疫制御分子。

11. 当該ペプチドが配列表の配列番号 8 に記載のペプチドを有する、請求項 7 または 10 に記載の免疫制御分子。

12. 配列表の配列番号 8 に記載のペプチドを有する免疫制御分子により認識される免疫関連因子。

13. 請求項 1 から 11 のいずれかに記載の免疫制御分子を含有することを特徴とする免疫制御剤。

14. 請求項 1 から 11 のいずれかに記載の免疫制御分子を組み込んだ、キャリアーまたは蛋白質を含有することを特徴とする免疫制御剤。

15. 請求項 13 または 14 に記載の免疫制御剤を含有することを特徴とする免疫増強剤。

16. 請求項 13 または 14 に記載の免疫制御剤を含有することを特徴とする免疫抑制剤。

17. 特異的な相互作用をする 2 分子のうちのいずれか一方の分子の相互作用部位と類似した立体構造を有するペプチド配列の製造方法であって、該分子の相互作用部位の立体構造を認識する抗体を用いて 8 個以上のアミノ酸配列を提示するファージランダムペプチドライブラリーをスクリーニングすることによって、該分子の相互作用部位と類似した立体構造を有するペプチド配列を単離することを特徴とする方法。

18. 当該分子の一つが CTLA-4 である請求項 17 に記載の方法。

19. 当該立体構造を認識する抗体が、抗 CTLA-4 モノクローナル

抗体である請求項 17 または 18 に記載の方法。

20. 当該ペプチドが、2 個のシステイン (C y s) 残基を有し、当該システイン残基は C y s - C y s 結合を形成しており、かつ当該 C y s - C y s 結合間に少なくとも 6 個のアミノ酸からなる配列を有するペプチドである請求項 17 から 19 のいずれかに記載の方法。

21. 当該ペプチドが配列表の配列番号 4 に記載のペプチドであり、少なくともアミノ酸番号 4 番目から 15 番目の配列を有する、請求項 20 に記載の方法。

22. 当該ペプチドが配列表の配列番号 4 に記載のペプチドを有する、請求項 20 または 21 に記載の方法。

23. 当該ペプチドが配列表の配列番号 8 に記載のペプチドであり、少なくともアミノ酸番号 8 番目から 15 番目の配列を有する、請求項 20 に記載の方法。

24. 当該ペプチドが配列表の配列番号 8 に記載のペプチドを有する、請求項 20 または 21 に記載の方法。

図 1

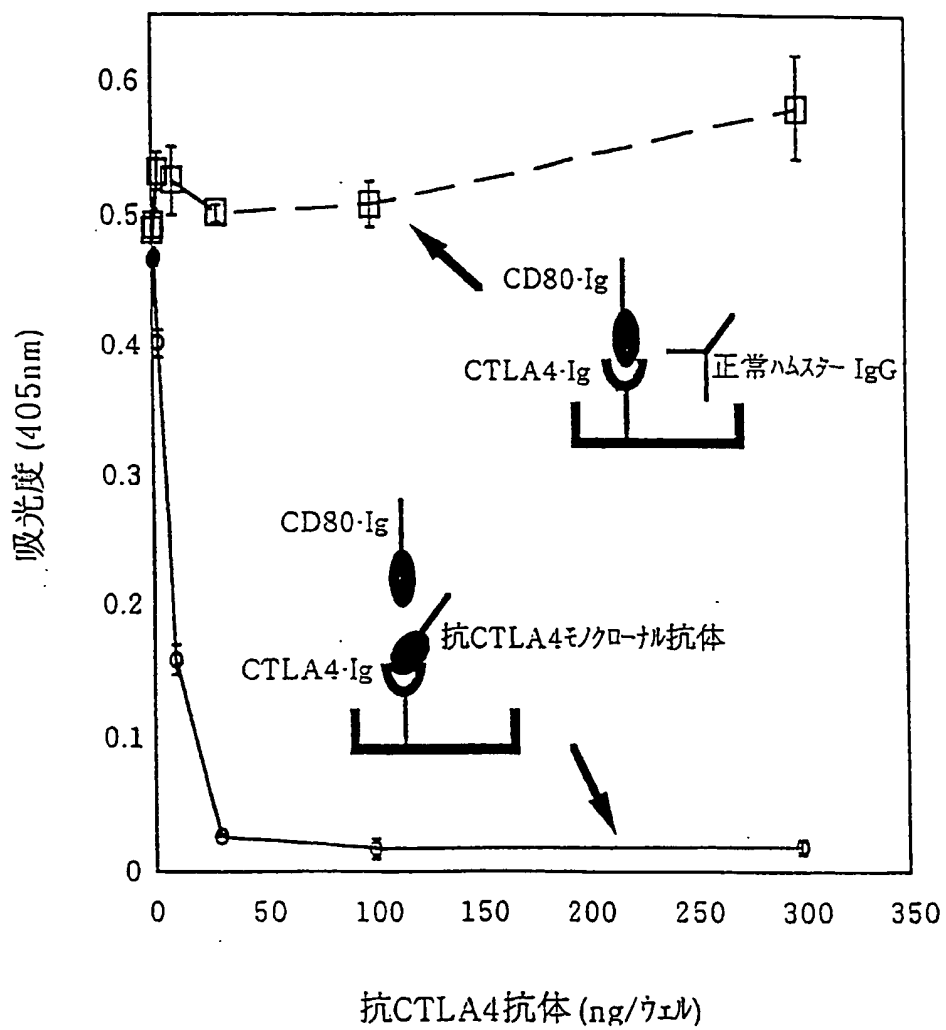


図 2

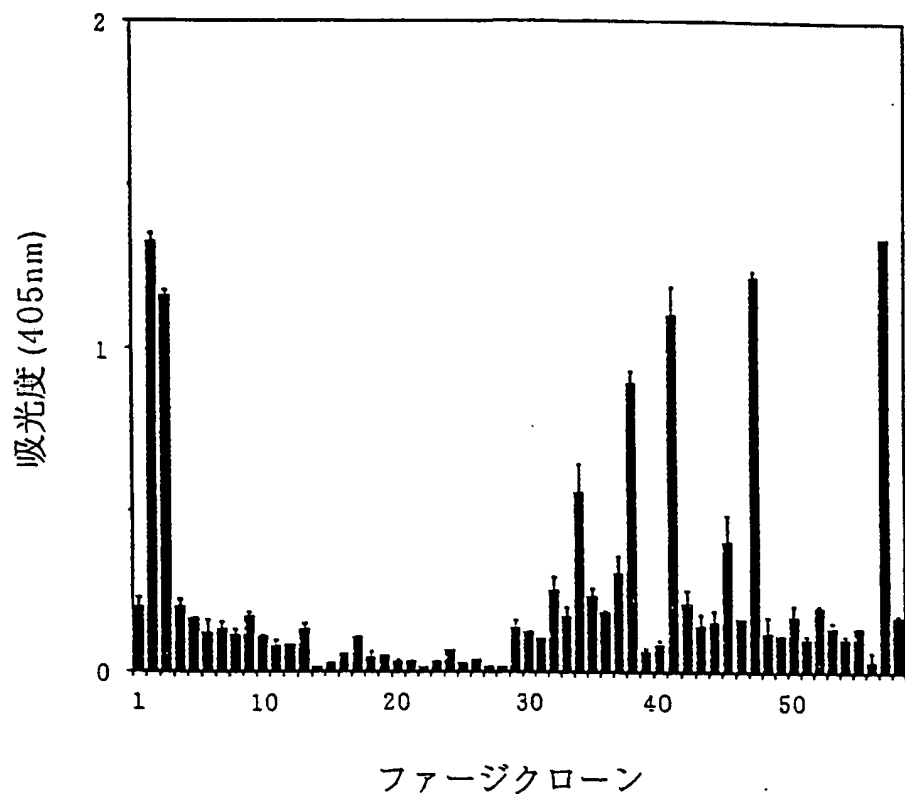


図 3

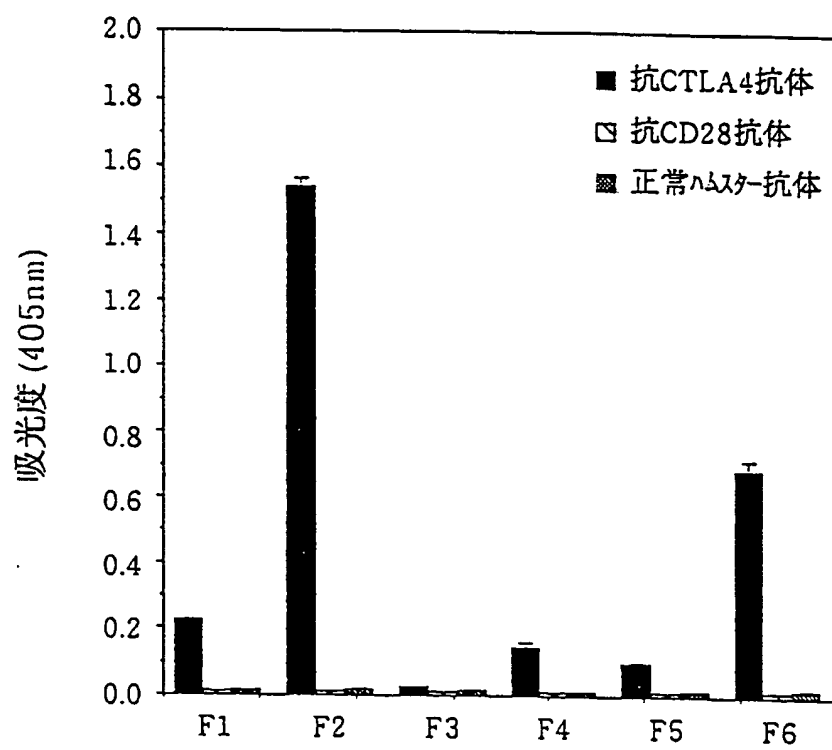


図 4

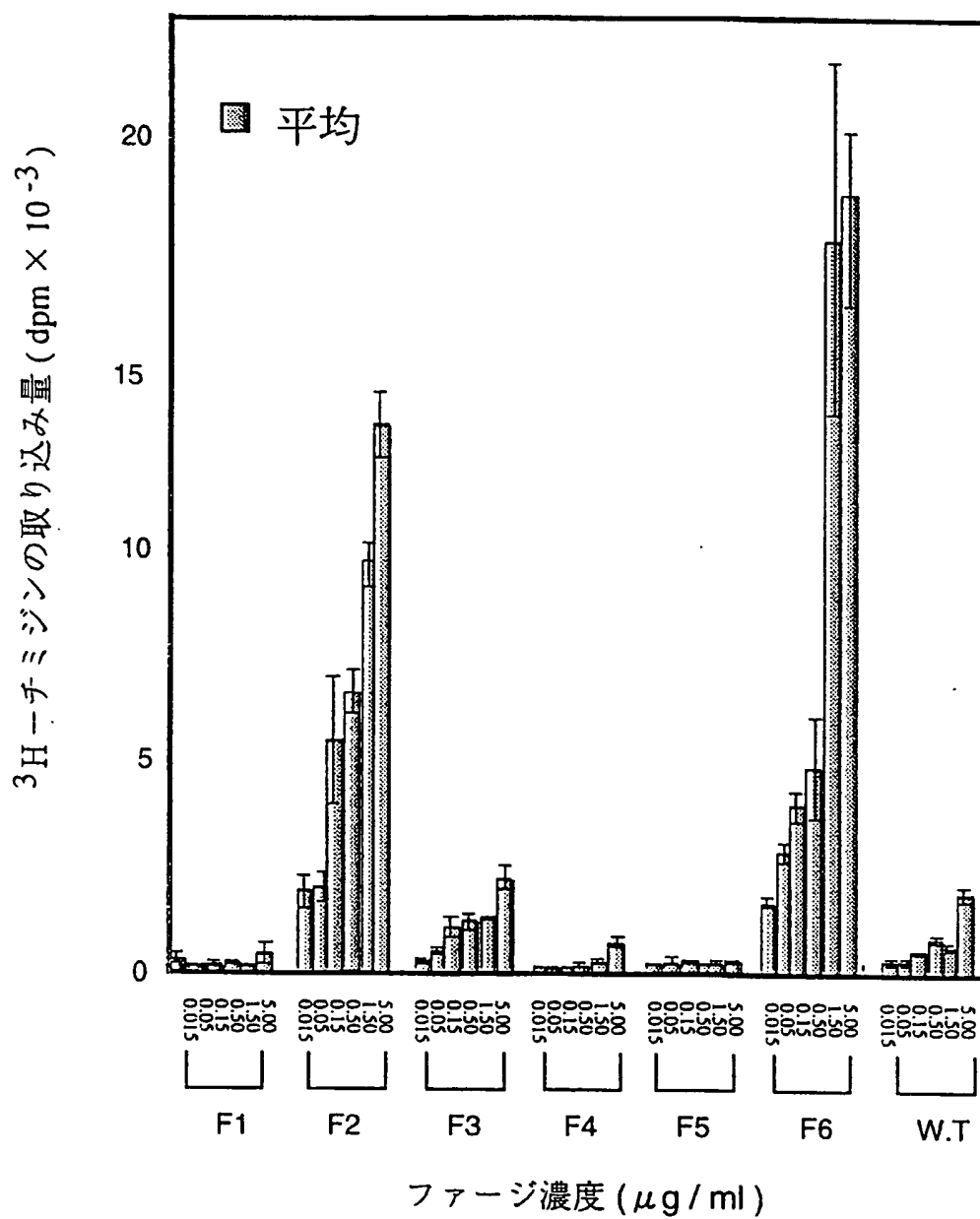


図 5

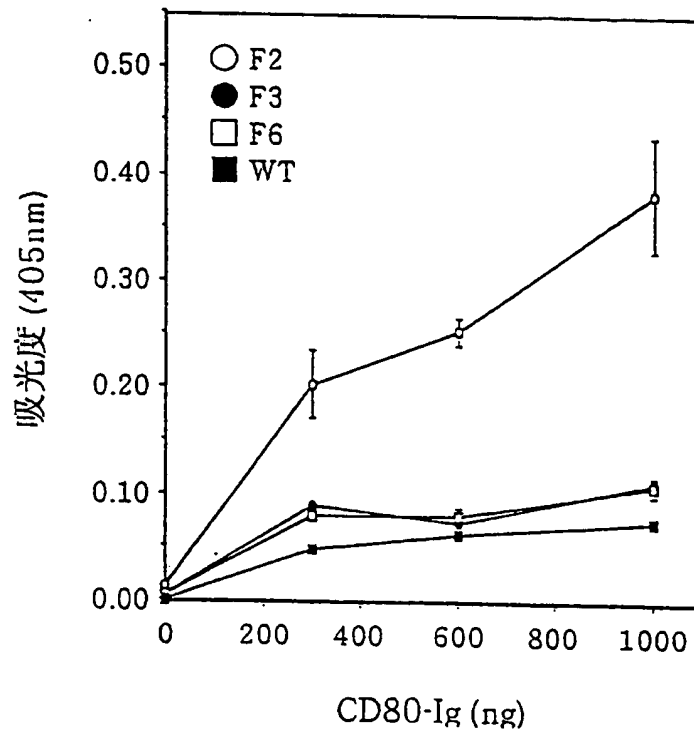


図 6

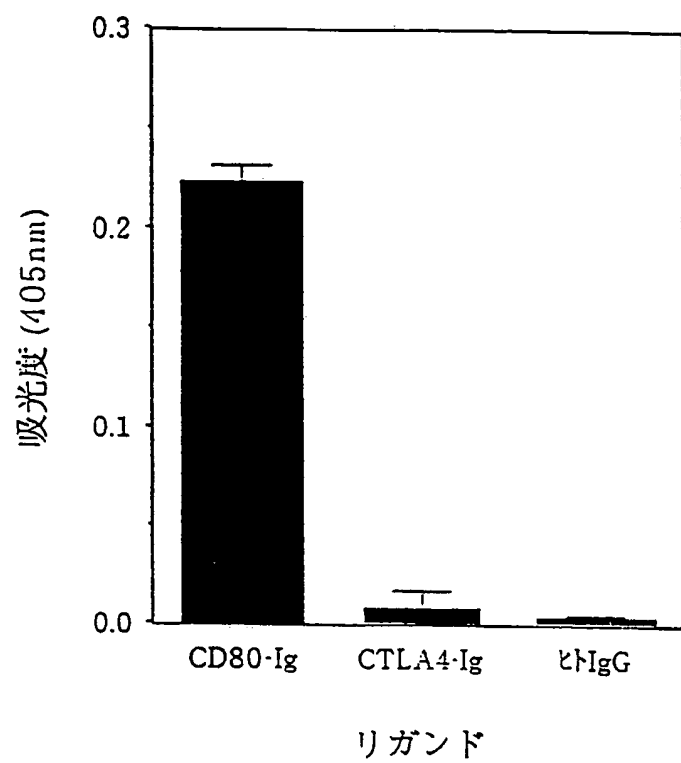


図 7

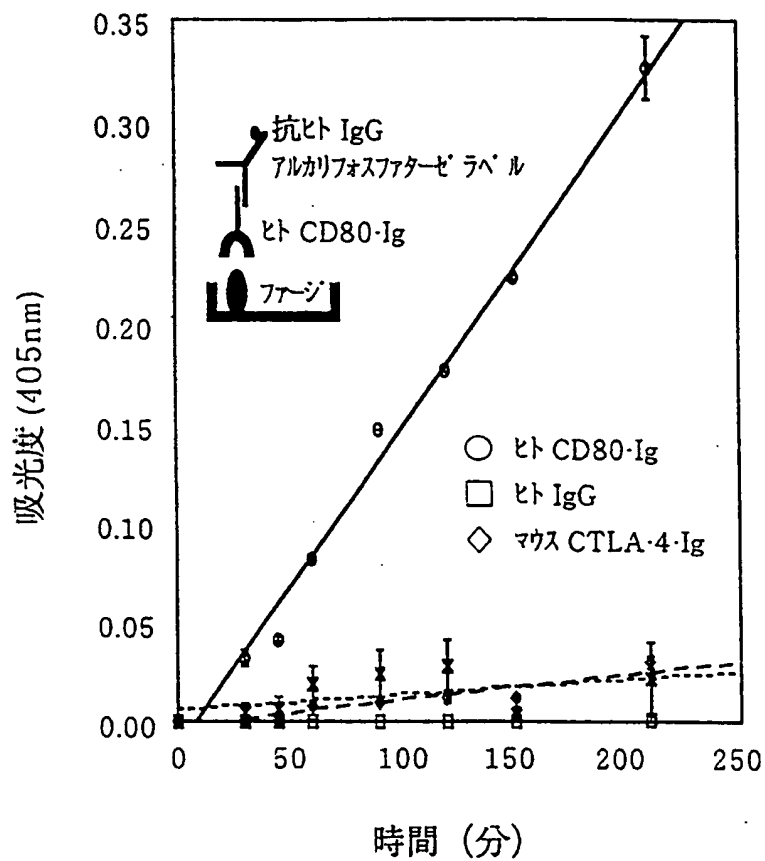


図 8

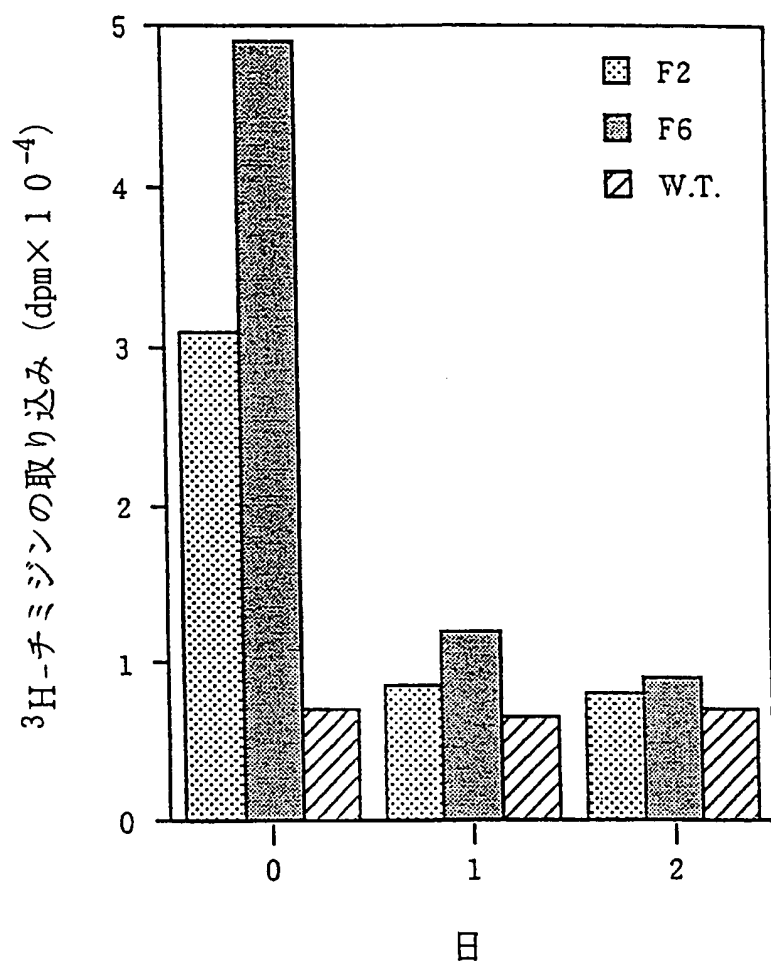


図 9

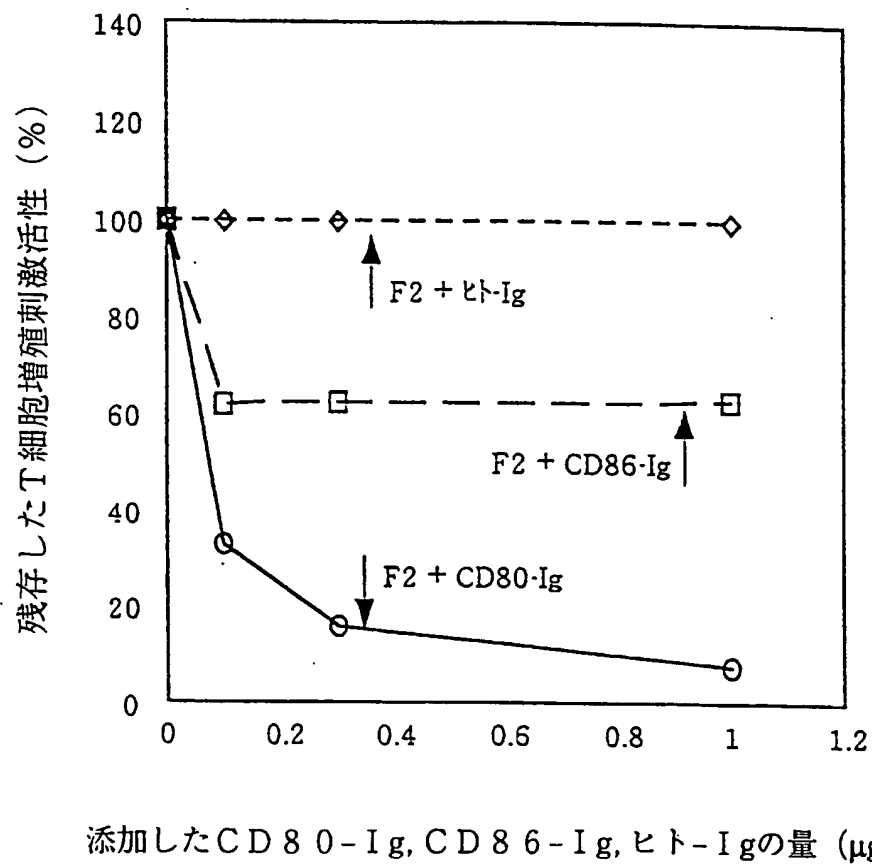
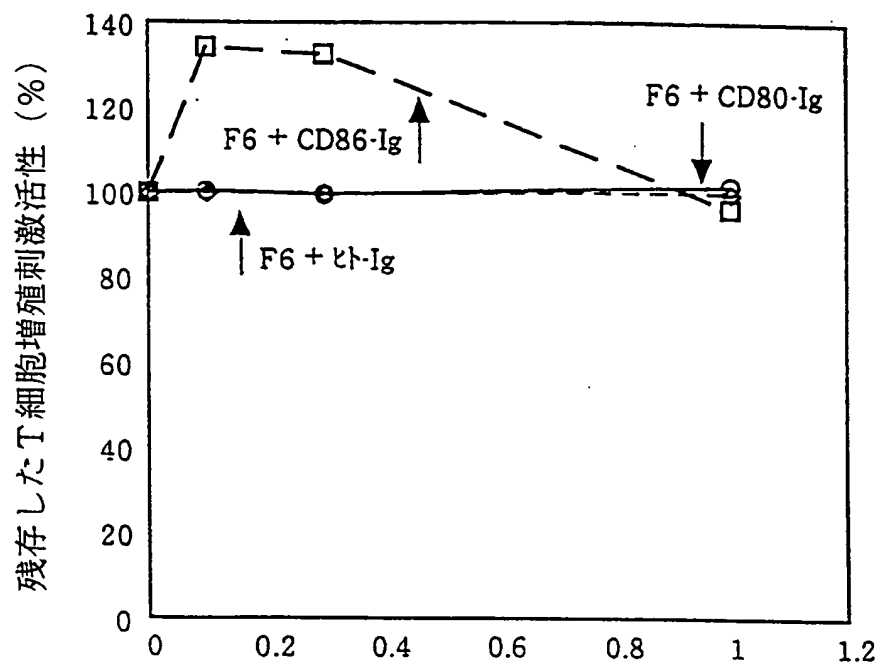
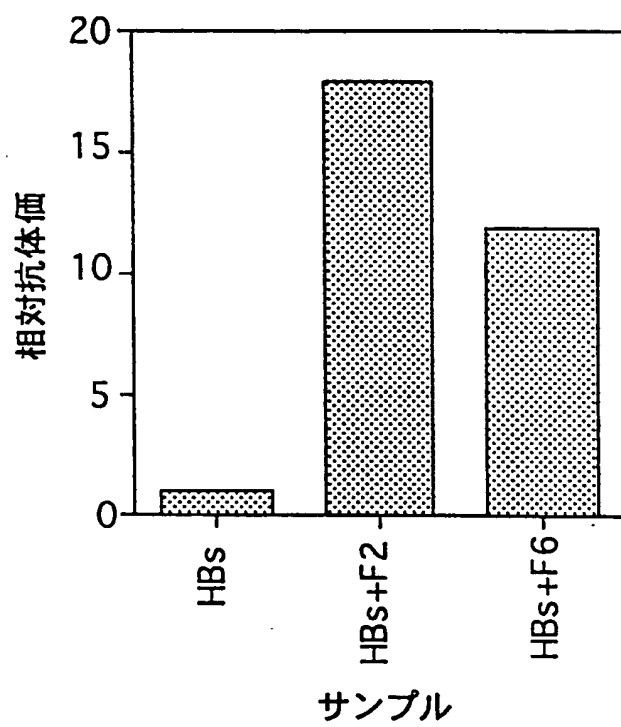


図 10



添加したCD80-Ig, CD86-Ig, ヒト-Igの量 (μg/ml)

図 11



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02540

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl ⁶ C12N15/11, C12P21/00, C07K14/725, G01N33/53, G01N33/577, C07K16/28, C12P21/08 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. Cl ⁶ C12N15/11, C12P21/00, C07K14/725, G01N33/53, G01N33/577, C07K16/28, C12P21/08 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI (DIALOG) ; BIOSIS (DIALOG) ; CA (STN) ; REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	De ciechi P.A. et al. "Utilization on multiple phase display libraries for the identification of dissimilar peptide motifs that bind to a B7-1 monoclonal antibody" Molecular Diversity (1996, Feb.), Vol. 1, No. 2, p. 79-86	1-2, 5 3-4, 6-7, 13-20
Y	Moshe B. et al. "Identification of a hexapeptide that mimics a conformation-dependent binding site of acetylcholine receptor by use of a phage-epitope library" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) Vol. 90, p. 10638-10642	2-7, 13-20
Y	Avner Y. et al. "Isolation of peptides that inhibit binding of basic fibroblast growth factor to its receptor from a random phage-epitope library" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) Vol. 90, p. 10643-10647	2-7, 13-20
Y	Nishi, T. et al. "Method of Preparation and Application of Phage Random Peptide Library (in	2-7, 13-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search October 21, 1997 (21. 10. 97)		Date of mailing of the international search report November 5, 1997 (05. 11. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/02540

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Japanese)" Jikken Igaku (1993), Vol. 11, No. 13, p. 95-100	
$\frac{X}{Y}$	Peter S.L. et al. "Coexpression and functional Cooperation of CTLA-4 and CD28 on Activated T Lymphocytes" J. Exp. Med. (1992), Vol. 176, No. 6, p. 1595-1604	$\frac{1}{2-3, 7, 13-20}$
$\frac{X}{Y}$	Deborah J.L. et al. "Differential Effects of Anti-B7-1 and Anti-B7-2 Monoclonal Antibody Treatment on the Development of Diabetes in the Nonobese Diabetic Mouse" J. Exp. Med. (1995), Vol. 181, No. 3, p. 1145-1155	$\frac{1}{2, 5-6, 13-20}$
$\frac{X}{Y}$	Kenneth E.T. et al. "Stimulation of CD28 Triggers an Association between CD28 and Phosphatidylinositol 3-Kinase in Jurkat T Cells" J. Exp. Med. (1994), Vol. 179, No. 3, p. 1071-1076	$\frac{1}{2, 4, 13-20}$
$\frac{X}{A}$	Matthew F.K. et al. "CD28 and CTLA-4 Have Opposing Effects on the Response of T cells to Stimulations" J. Exp. Med. (1995), Vol. 182, No. 2, p. 459-465	$\frac{1}{2 - 24}$

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 97/02540

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N15/11, C12P21/00, C07K14/725, G01N33/53,
G01N33/577, C07K16/28, C12P21/08

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁸ C12N15/11, C12P21/00, C07K14/725, G01N33/53,
G01N33/577, C07K16/28, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), CA (STN), REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	De ciechi P.A. et al. "Utilization of multiple phage display libraries for the identification of dissimilar peptide motifs that bind to a B7-1 monoclonal antibody" Molecular Diversity (1996, Feb) 第1巻 第2号 p. 79-86	1-2, 5 3-4, 6-7, 13-20
Y	Moshe B. et al. "Identification of a hexapeptide that mimics a conformation-dependent binding site of acetylcholine receptor by use of a phage-epitope library" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 第90巻 p. 10638-10642	2-7, 13-20
Y	Avner Y. et al. "Isolation of peptides that inhibit binding of basic fibroblast growth factor to its receptor from a random phage-epitope library" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 第90巻 p. 10643-10647	2-7, 13-20

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 10. 97

国際調査報告の発送日

05.11.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

平田 和男

印

4 B

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Nishi, T. et al. "ファージランダムペプチドライブラリーのつくり方と応用" 実験医学 (1993) 第11巻 第13号 p. 95-100	2-7, 13-20
<u>X</u> Y	Peter S. L. et al. "Coexpression and functional Cooperation of CTLA-4 and CD28 on Activated T Lymphocytes" J. Exp. Med. (1992) 第176巻 第6号 p. 1595-1604	<u>1</u> 2-3, 7, 13-20
<u>X</u> Y	Deborah J. L. et al. "Differential Effects of Anti-B7-1 and Anti-B7-2 Monoclonal Antibody Treatment on the Development of Diabetes in the Nonobese Diabetic Mouse" J. Exp. Med. (1995) 第181巻 第3号 p. 1145-1155	<u>1</u> 2, 5-6, 13-20
<u>X</u> Y	Kenneth e. T. et al. "Stimulation of CD28 Triggers an Association between CD28 and Phosphatidylinositol 3-Kinase in Jurkat T Cells" J. Exp. Med. (1994) 第179巻 第3号 p. 1071-1076	<u>1</u> 2, 4, 13-20
<u>X</u> A	Matthew F. K. et al. "CD28 and CTLA-4 Have Opposing Effects on the Response of T cells to Stimulations" J. Exp. Med. (1995) 第182巻 第2号 p. 459-465	<u>1</u> 2-24

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.